

• 专家共识 •

宏基因组学测序技术在中重症感染中的临床应用专家共识（第一版）

宏基因组学测序技术在中重症感染中的临床应用共识专家组 中国研究型医院学会脓毒症与休克专业委员会 中国微生物学会微生物毒素专业委员会 深圳市医学会重症医学专业委员会
执笔人：李颖 麻锦敏

深圳大学第一附属医院（深圳市第二人民医院）重症医学科，广东深圳 518015

通信作者：姚咏明，Email：c_ff@sina.com；冯永文，Email：fengyongwen2008@126.com

【摘要】 基于宏基因组学测序(mNGS)的病原学诊断技术是一种非靶向的广谱病原学筛查技术，近几年来越来越多的研究表明其在重症感染领域，特别是疑难、罕见病导致的重症感染中发挥了关键性作用。由于mNGS高昂的成本及较高的实验条件要求，目前尚未纳入常规临床检验中。可以预见，随着测序成本的下降及我国医疗水平的不断提高，基于mNGS的病原学诊断技术在临床大规模开展的条件已经逐步成熟。本文从检测、规则和应用等方面阐述了基于mNGS技术在临床中重症感染患者病原学诊断中应用的专家共识，并对其未来在临床应用改进方面提出了展望。

【关键词】 病原学诊断；宏基因组学；重症感染；专家共识

基金项目：国家自然科学基金(81730057)；军队“十三五”军事医学创新工程重点项目(18CXZ026)；广东省医学科学技术研究基金(B2015072)

DOI：10.3760/cma.j.cn121430-20200228-00095

Expert consensus for the application of metagenomic next generation sequencing in the pathogen diagnosis in clinical moderate and severe infections (first edition)

Consensus Group of Experts on Application of Metagenomic Next Generation Sequencing in the Pathogen Diagnosis in Clinical Moderate and Severe Infections; Professional Committee of Sepsis and Shock, Chinese Research Hospital Association; Professional Committee of Microbial Toxins, Chinese Society for Microbiology; Professional Committee of Critical Care Medicine, Shenzhen Medical Association; Li Ying, Ma Jinmin

Department of Critical Care Medicine, First Affiliated Hospital of Shenzhen University (Shenzhen Second People's Hospital), Shenzhen 518015, Guangdong, China

Corresponding author: Yao Yongming, Email: c_ff@sina.com; Feng Yongwen, Email: fengyongwen2008@126.com

【Abstract】 Metagenomic next generation sequencing (mNGS) is a non-targeted and broad-spectrum pathogen screening technology. In recent years, more and more studies have shown that mNGS pathogen detection plays a key role in the field of clinical severe infection, especially when the severe infection was caused by rare pathogens. However, due to its high cost and high requirements of experimental conditions, it has not been included as a routine clinical test yet. Nevertheless, it can be predicted that with the decrease of sequencing cost and the continuous improvement of medical level in China, the conditions for large-scale clinical application of pathogenic diagnosis based on mNGS have gradually matured. This consensus described the expert consensus of etiology diagnosis based on mNGS in the scope of detection, rules and applications in clinical moderate and severe infections, and also looked forward to the improvement of its clinical application in the future.

【Key words】 Pathogen diagnosis; Metagenomics; Severe infection; Expert consensus

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81730057); Key Project of Military Medical Innovation Program of the Chinese People's Liberation Army (18CXZ026); Medical Scientific and Technologic Research Foundation of Guangdong Province of China (B2015072)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200228-00095

病原学诊断是感染性疾病诊断中最重要的一环，对于提升中重症感染性疾病的诊疗质量至关重要，其中分子诊断是病原学诊断中的一个重要方向。随着现代分子生物学技术的发展，出现了很多分子诊断方法，如DNA限制性内切酶分析技术、核酸探针杂交技术、聚合酶链反应(PCR)技术和环介导等

温扩增(LAMP)技术等^[1-4]。这些技术的发展促进了临床病原体检测的精细化，在常见感染的诊断方面发挥了巨大作用。病原体高达上万种，但常规的临床病原学诊断往往只能针对几种目标病原体进行检测，且目标病原体的检测依赖于临床医生的判断。因此，由于病原体的多样性，传统检测手段的局限

性,以及临床医生对目标病原体的判断水平参差不齐,在临床上超过 2/3 的感染性疾病最终仍无法鉴定其病原体,导致临床不能针对性地用药,经验试错情况时有发生。这一困境在临床重症感染性疾病,特别是由疑难、罕见的病原体导致的临床重症型病例上尤其严峻。

随着基因组学技术的发展,高通量测序技术〔又称下一代测序技术(NGS)〕越来越广泛地应用于感染性疾病的溯源、检测、分型和耐药评估等各个方面,并且朝着快捷、经济的方向飞速发展^[5]。2008 年和 2011 年,Palacios 等^[6]与 Xu 等^[7]分别采用宏基因组及宏转录组发现了两个临床感染病例的新发病原体,分别为沙粒病毒和新型布尼亚病毒,开启了宏基因组学测序(mNGS)技术在临床感染中应用的先例。由于 mNGS 不依赖于特定基因引物的序列扩增,而是将待测样本的所有 DNA 或 RNA 混合测序,并通过将测序数据与病原体数据库进行比对,获得病原体的分类信息,因此能在较短的时间内完成对样本的无靶向检测,单次即可检测上千种病原体,检测的病原体种类包含病毒、细菌、真菌和寄生虫等^[8-9]。

就现阶段而言,受限于高昂成本,mNGS 主要集中应用于重大疾病、突发公共卫生事件和特定病例人群,目前尚未纳入常规临床检测^[10]。此外,由于临床测序检测设备还未实现小型化、设备实验条件的标准过高、临床感染工作者对 mNGS 的认知和接受程度不足,以及检测结果的科学判读证据与逻辑尚待证实等原因^[11-14],mNGS 临床应用开展仍不广泛。可以预见,随着测序技术的进步、测序成本的降低以及生物信息手段的提升,mNGS 在临床的应用会逐渐广泛开展起来^[11]。因此,为了进一步促进和规范 mNGS 的合理应用,兼顾社会经济负担,促进病原体的诊断、正确判读检测结果和意义,我们组织重症、感染病学(含传染病学)和病原微生物学相关领域的专家共同研讨并制定了本共识。由于本共识是总体指导意见,不进行具体证据分级。

1 检测与质控

1.1 检测设施设备控制:必须按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》的相关规定开展临床 mNGS。检测实验室应符合《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》的相关规定。实验室空气洁净度需要建立标准对照和监测系统,实验室存在的背景微生物需要进行定期的汇总更新。测序设备需要采用获得国家医疗器械注册许可的测序平台。

1.2 检测实验质控:mNGS 过程主要包括样本处理(包含运输)、核酸提取、文库构建、上机测序及数据比对与判读。对于这些影响检验结果的关键过程,需要有相应的质控点,包括运输过程保持低温状态、核酸提取质量、文库出库浓度和片段分布大小、下机总数据量、有效数据量、测序质量及数据分析可靠性等,任何不符合质控标准的检测都应及时终止并重新检测,或者在无法重新检测的情况下,可提供预警,以供临床参考。全流程的质控标准应包含但不限于如下几点:① 每批次实验中都应该包括内参和(或)阳性、阴性对照品。② 内参和(或)阳性对照品被有效检出且检测到的碱基序列片段数量应该满足实验预期的检测敏感度阈值。③ 对于不同类型的样本,建议有基本的序列数据量。因为 mNGS 的科学原理是对临床样本中的所有核酸进行高通量测序,除了测试到样本中包含的病原体序列信息外,一定也包含了人基因组或转录组的序列。由于临床样本中微生物的核酸含量远低于人核酸含量,通常不足人核酸含量的 5%。因此,为了得到临床可信的检测结果,理论上需要将所有核酸都测试一遍,这就对测序的数据量提出了基本的要求。由于不同类型的临床样本中人宿主核酸的含量是不同的,因此对不同类型样本的测试数据量的要求也不同。在主要代表类型样本中,单位体积的人核酸含量排序为脑脊液<支气管肺泡灌洗液<血浆<痰液<胸腹水,本共识推荐的高通量测序序列数依次为 2000 万条(20 million, 20 M)、4000 万条(40 million, 40 M)、5000 万条(50 million, 50 M)、8000 万条(80 million, 80 M)、1 亿条(100 million, 100 M)。对于痰液和胸腹水样本,不仅是数据量需要增加,还需要进行适当的人核酸去除来确保检测的敏感度。④ 为确保序列比对的准确性,避免因同源错配导致的序列比对错误,建议测序序列读长不少于 50 bp(单端读长 50 个碱基)。推荐采用临床应用级别的数据库,对临床病原体的不同种、不同型别有满足需求的区分度。生物信息分析流程应该有统一标准,自动化为主,人工纠错为辅。建议 mNGS 结果报告应涵盖该批次实验中的内参、阴性和阳性对照品结果,并记录相关质控标准,如测序质量、单个样本数据量、序列读长、检出的病原体序列数及相对丰度等。

1.3 测序结果的实验室判读控制:目前不同厂家测试产品的病原体检测判读阈值可能不同,因此下列标准应适用于所有二代测序病原体检测流程。满足

质控标准的合格的下机数据进入分析解读流程后,应遵循以下原则:①剔除试剂、环境中引入的假阳性病原体信息;②剔除比对流程中交叉引入的假阳性病原体信息;③报告病原体信息原则上准确到种(检出序列数极少、相似度极高的病原复合群和分节段分型的病毒等例外),同时也应包含相应的属信息;④建议将临床高度关注和健康者样本中极少出现的病原体信息优先呈现(即高度致病可能性),同时将某些部位(如呼吸道、皮肤、肠道等)的常见、低(或无)致病性病原体(定植菌等)独立呈现。

1.4 数据库建设:用于生物信息分析的数据库构建包括两个内容,即人源数据库和病原体数据库。人源数据库收集需尽可能完整,不仅包含染色体基因组,还要包括线粒体等基因组、转录组及非编码序列信息。病原体数据库收录的信息应该覆盖主要的病原体,且确保每条收录的序列数据准确完整。

2 规则及应用

2.1 不同病原体检测方法的特点:临床样本中病原体的常规检测范围包括鉴定培养物中生长的微生物,通过血清学实验检测特定微生物的生物标志物[如通过乳胶凝集进行抗原检测或通过酶联免疫吸附试验(ELISA)进行抗体检测],或通过分子生物学实验进行单个或多重病原体特异核酸检测。这些方法虽然多,并且可以组合应用,对于常见高发感染也非常有效,但是它们都属于试错型,高度依赖于临床医生的判断选择。目前在重症感染病例的诊断上,试错型尝试病原体检测耗时较长,临床总体阳性率也比较低。临床 mNGS 的技术特点是能够大范围甚至是全方位试错,为临床医生提供了一个快速的检测手段。但目前由于新技术的成本较高,且 mNGS 与宏转录组学测序(mtNGS)存在差异,导致临床敏感度与预期相对较低,简单地增加成本投入能有效提高临床敏感度。此外,临床 mNGS 除了测序生化反应外,还包含了病原体数据库自动分析比对专家系统,对于检测结果的准确性也非常重要,故不是一个简单的测序反应。一线工作人员,尤其是从事重症病例治疗的医生,需要对 mNGS 的临床应用有更多的了解,才能使 mNGS 更好地服务于临床。

2.2 mNGS 报告解读规则:mNGS 报告通过测序短序列的数量进行物种的鉴定,碱基序列片段数量越大,表明该物种在样本中存在的可能性越高,但需要区分不同物种。同时需要考虑基因组的覆盖度,覆盖度与可信度呈正相关,但并非呈线性正相关。

2.3 阴性结果的解读:mNGS 报告中的信息是经过特定阈值过滤后的结果,如果是阴性报告,首先需要分析患者的具体情况,再研究除报告外的原始检测结果,判断是因为未达到阈值误判,还是确实不存在病原体。可以根据具体的临床信息,在报告阈值之外考虑可能的原始检出感染病原体,如胞内感染菌。在阴性结果中,如果没有进行 RNA 的宏基因组检测(也称为 mtNGS),可能遗漏了以 RNA 为遗传物质的病毒,需进一步检测宏转录组以明确病原体,如一种新型病毒性脑炎 RNA 病毒的发现^[15],否则存在假阴性的可能。对于某个临床样本, mNGS 和 mtNGS 都为阴性的情况下,且内参检测值提示该样本中单位体积内(通常为 1 mL)已知最小病毒小于 10 个分子时,可以考虑阴性价值,即患者不存在感染性疾病,可能存在免疫性疾病和肿瘤等^[16]。

2.4 阳性结果的解读:因不同部位临床样本的背景微生物存在差异,故阳性的判读需要建立阈值才可以将真阳性的病原体从背景微生物中分离出来。这些阈值可以包含一些指标,如检出特定微生物序列的数量、归一化为每百万序列的相对值、检出微生物的基因组覆盖度及内参对照的检出等情况。但需要在相同的测序平台、相同的实验室进行比较,以排除平台和环境差异带来的影响。而当某个鉴定达到阳性判断阈值后,其增量与可靠性呈正相关,但并不呈线性相关,在未达到阈值时,其增量与鉴定可靠性呈指数正相关。因此,在判断阳性时,达到阈值即可信。此外,在阳性报告中,如果有多种微生物大量存在,则应结合定植微生物考虑假阳性物种。而针对一些常见病原体,需考虑并增加耐药基因的检测,以提供更多的临床治疗指导方案。

2.5 常见微生物检测结果与临床检测结果不一致,且不能排除感染时,应作为怀疑的依据,再次送高通量检测;如果高通量检测的对应病原体序列升高,则提示有非常见的微生物,与临床信息吻合,应选择靶向抗感染治疗。

2.6 非体内正常定植菌的外来侵入性微生物在非感染部位出现,一旦被检出,即认为是病原体。

2.7 对于区别背景微生物、病毒以及快速分裂期的微生物,mRNA 的诊断价值有待进一步临床观察与研究加以证实。如果相应 mRNA 序列数增加,则提示可能存在 DNA 病毒快速繁殖,要与病毒 RNA 进行鉴别^[17]。

2.8 延迟阳性:有一些病原体由于被吞噬细胞吞

噬,经一段时间裂解释放核酸后才能被检出,需考虑多次送检。

2.9 物种差异判读:不同的病原体类型对应的阈值不同,应分类解读。

2.9.1 病毒:一些显著区别于人基因组序列的病毒,如腺病毒和流感病毒等,有少量的特异序列检出即可信,其阈值通常在 3/100 万及以上即可信;而一些与人源序列相似度高的病毒,如反转录病毒类,在检出序列较少时,因无法判断是否来自一些转录元件,只有更多序列检出时才可信,其阈值通常需要超过 1000/100 万,因为哪怕确实是某类反转录病毒,相对较少的检出序列也更多指向其在人体内是潜伏状态,而不是感染状态。

2.9.2 真菌:真菌的基因组较大,并且存在较厚的细胞壁,因此在核酸提取的效率上会大打折扣,即使进行了一些破壁处理,其检出的特异序列数仍然不会很多,因此对于真菌的鉴定,其阈值考虑在 5/100 万以上,在达到 100/100 万以前,其可信度随序列数增加而增加。

2.9.3 细菌:对于一些细菌来说,要着重区分是定植菌、污染还是真正的病原菌。对于非胞内感染菌,因不同细菌间存在同源相似性,菌种间可信阈值差异较大,并且因不同实验室而有差异,因此鉴定报告应给出具体菌种的阳性参考阈值,并列背景菌作为参考;而对于胞内感染菌,如结核分枝杆菌^[18]和军团菌的阈值相对较低,通常有 1/100 万即可考虑可信,随着序列数增加,其可信度逐渐增加,但达到 30/100 万时,其增量不再有增加可信度的意义。

2.9.4 寄生虫:因为目前寄生虫的基因组参考数据库种类不多,且寄生虫生物的多样性,作为真核生物,有很多与人基因组相似的元件,因此在判断阳性时要特别要求序列的特异性。寄生虫作为阳性判断的阈值需在 10/100 万以上,并且需要严格确认序列的特异性。

2.10 罕见病原体的阳性价值:罕见病原体在报告中出现时,需要进一步确定其致病性及临床特征,包括感染病灶的影像。罕见病原体的确认需要进一步调查患者病史,以确定其为动物疫源^[19]或者环境疫源^[20]的流行病学证据。

2.11 污染与定植:在 mNGS 报告中,需要考虑取样和样本处理等环节带来污染的可能性。例如:呼吸道肺泡灌洗液的样本报告有大量的口腔菌,首先考虑取样是否存在污染,其次考虑由于特殊原因造成

的感染。但是如果存在非常多的背景微生物或者杂菌,且没有 1 种或者几种病原体占有主导量的优势,可以间接考虑患者免疫状态严重破坏,需要引起治疗和护理上的重视。

3 mNGS 技术展望

3.1 耐药和突变的鉴定:目前, mNGS 得到的微生物序列在整个样本的总序列中占有极少的比例,通常不到 5%,但鉴定的种类却很多。因此,每种微生物的鉴定虽然有结果,但是基因组的覆盖度却很低,一般不到 1%。在这样的覆盖度下难以鉴定基因水平的信息,如耐药基因(ARGs)的鉴定和基因突变的鉴定。在纯科研领域采用高深度的测序结合宿主背景微生物的扣除已经实现,但临床应用成本太高,不适合普及。因此,一种更有效、廉价的 mNGS 鉴定加耐药鉴定将解决更多的临床需求,目前有公司推出的升级产品在 mNGS 基础上叠加耐药基因检测,可能是目前比较经济的过渡方法。

3.2 mtNGS:随着技术的进一步发展,可以完成样本宏转录组的检测^[21]。mtNGS 技术是 mNGS 的进一步升级,是对样本中所有转录组的高通量定量检测。mtNGS 技术对中枢神经系统感染中病原体的鉴定能扩展到以 RNA 为遗传物质的病原体物种,如对肠病毒等 RNA 病毒的鉴定,这是 mNGS 无法达到的。另外, mtNGS 技术是对检测样本所有转录组进行检测,因此能够对样本中涉及到的人体免疫细胞进行全部近 2 万个基因的鉴定和定量,进一步可以分析细胞基因表达差异和代谢通路,体现细胞的免疫状态,展示病原体与宿主的相互作用,对疾病的诊断更加个体化和精准化。当然,该方法对技术和受检样本质量的要求也更高,对技术环节的要求也更加严格。所以目前 mtNGS 的临床应用还落后于 mNGS 的应用。

3.3 检验设备标准缺失,多种因素对结果解读的影响: mNGS 的局限性在于该方法的敏感度与人源背景微生物水平有关。例如:组织相对于无细胞体液增加了人类宿主比例,微生物序列的数量和比例相应减少,导致检测敏感度降低^[10]。因此,提升数据量,即加深测序深度是解决该问题的很好办法,但这必将增加测试成本。同时, mNGS 的整个运行流程还不够简化,操作较为复杂,相比单个或者多重的 PCR 检测来说操作步骤更加复杂,对于检测人员技术要求较高,测序仪器的差异对结果解读也会带来影响,而目前还没有对于测序仪器应用的标准,不利

于在临床一线开展,因此,自动化平台成为了临床需求。自动化包括:①样本处理;②文库构建;③高通量测序;④生物信息分析;⑤报告发送。有研究机构已经完成了②到⑤步骤,第一步样本处理也已经完成了相对简单的血液、脑脊液等处理的自动化,但是感染性样本类型繁杂,目前仅实现了血液等简单样本处理的自动化,还远不能满足临床需求。因此,更完善的自动化本地实验室检测将是更大的需求。完整的、有标准的一体机的使用将进一步推进 mNGS 在临床的应用。

3.4 mNGS 时长的优化: mNGS 的临床应用已初步显示出其广谱鉴定病原体的有益效果,但目前很多方式都是在第三方实验室集中检测,需要将样本寄送到指定实验室,物流将花费整个检测周期 1/2 甚至 2/3 的时间。因此,在有需求的医疗机构开展 mNGS 病原体检测,是直接有利于患者的简单有效手段,这将给患者,尤其是重症患者争取 1/2 以上的检测时间,在更短的时间内得到病原体检测结果^[10, 22-23]。

3.5 临床数据和微生物基线: mNGS 的高敏感度能够得到全谱微生物,包括病原微生物和定植微生物。但是不同人群,如不同年龄、不同基础疾病(炎症性肠病和糖尿病等)人群,有着不同的背景微生物。虽然人体微生物组计划已经进行了超过 10 年^[24-25],但对于目前临床应用来说,并没有按照特定人群进行阈值调整,而是采用统一的检测序列数标准^[26]或者拼接序列数标准^[27]。因此,不同人群的差异解读、病例基线和临床表型的具体生物标志物及个体免疫的综合作用,在未来应被纳入更多的重症感染疾病诊断和治疗当中,以便建立个人微生态档案,指导个体化鉴定和用药,为个体感染性疾病及时提供病原体信息和诊断依据。快速精准的床旁检测为早期靶向治疗、控制感染性疾病的传播、节约感染性疾病治疗费用和开拓广阔的应用前景创造了广泛的社会效益与经济效益。

3.6 目前利用 mNGS 进行病原体鉴定还存在临床应用的一些问题,这些问题应该在短期内解决。

3.6.1 产品本身的标准化和规范化: 当前 mNGS 主要于第三方实验室开展检测,各机构提供的产品性能尚无有效的监管手段,商业利益驱动下部分检测机构将数据量降低到 1 M ~ 5 M,造成了大量的临床假阴性。国家相关监管部门已经着手建立技术标准,对相关检测产品进行规范化监管势在必行。

3.6.2 数据库的完整性和准确性: 目前不同的检测

机构都提供了自己的病原体数据库,其完整性和准确性缺乏统一的标准,因此,相关部门应联合主流检测机构,进一步确定数据库的质量标准,用于规范和提升 mNGS 的应用。一些已经发表的公共数据库可以直接用于样本的鉴定分析^[28-29],但缺乏与临床相结合,其软硬件资源需求设定巨大,仅可用于科研。

3.6.3 算法的准确性和快速化: mNGS 报告通常含有多种病原体信息,其中不乏背景微生物。虽然这些微生物确实存在于样本中,但是与疾病的关系并不能明确,这也加大了报告解读的困难。更加准确的病原体鉴定算法和更快的鉴定速度应该是接下来努力的方向,快速、准确地鉴定定植菌和病原体将给临床应用带来革命性的突破。

4 结 语

目前 mNGS 只是病原体诊断新利器,是在其他临床病原体检测没有结果的情况下才选择的二线方法,尽管基于 mNGS 的病原体鉴定给临床实验室检测带来了新的技术和平台,尤其针对重症感染患者,无需经验尝试的检测过程给患者赢得了治疗时间。但目前 mNGS 的病原体单次检测费用仍然较高,且基于成本、报销、时间及法规方面的考虑仍然是常规临床实施的主要障碍^[30]。对于重症患者,尤其是重症监护病房(ICU)患者,快速全谱的病原体鉴定可争取靶向治疗时间,减少其他尝试性药物的使用,综合治疗费用可能更低。

目前,由于综合考虑了时间与费用问题,每个临床样本的处理和 mNGS 病原体检测的测序深度仅停留在相对较低的水平,因此其敏感度和功能也相对受限。一些非临床的科学研究采取了极高深度的测序和优化方法分析^[31-33],这种不计成本的方法使得一些新的病原体被发现。而这些方法在将来随着高通量测序费用的下降以及算法的优化,在临床应用上也会实现,包括但不限于直接在临床样本检测到耐药信息、新变异物种、定植和感染的区分等,为临床解决更多的实际问题。

总体来说,在众多的分子诊断技术中, mNGS 作为一种全面的直接检测方法,虽然目前的经济成本使 mNGS 不太可能在短期内成为临床一线检测手段,但在疑难杂症、危重症、免疫缺陷等特殊人群中仍具有成为病原体诊断准一线检测手段的潜力,是一种非常有效的广谱病原体筛查方法。此外, mNGS 与传统的分子、血清学检测等方法在感染诊断的检测中联合使用可发挥关键作用^[21]。

牵头人：冯永文、陈唯军、姚咏明

顾问：陈德昌、杜斌、邱海波、管向东、黎毅敏

共识专家组成员(按姓氏笔画排序)：于湘友、马涛、马中富、马四清、马晓春、王小智、王华东、王凌伟、王瑞兰、王福祥、毛恩强、方向明、邓颖、邓启文、卢中秋、付小云、冯永文、吕奔、朱曦、刘勇、刘文兰、刘志锋、刘克玄、刘良明、刘治洪、刘映霞、刘雪燕、许硕贵、孙运波、孙炳伟、纪玲、苏磊、杜斌、李颖、李文雄、李金秀、李金宝、李春盛、李银平、李维勤、杨明施、肖献忠、吴明、吴伟立、吴健锋、邱海波、汪健、宋志、张卫星、张西京、张庆红、张庆富、陈旭林、陈唯军、陈德昌、武宇辉、林兆奋、林洪远、罗亮、周敏、周立新、周发春、邹江宁、郑江、孟新科、胡大海、祝筱梅、姚咏明、秦建军、桂水清、桂培根、钱克俭、徐平、徐道妙、黄磊、麻锦敏、康焰、梁华平、彭志勇、覃铁和、程锦泉、舒强、童亚林、曾红科、管向东、熊宾、熊丽红、黎毅敏

秘书：郑伟、任佳丽、任迪

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Trindade PA, McCulloch JA, Oliveira GA, et al. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives [J]. Braz J Infect Dis, 2003, 7 (1): 32–43. DOI: 10.1590/s1413-86702003000100005.
- [2] Geller G, Dvoskin R, Thio CL, et al. Genomics and infectious disease: a call to identify the ethical, legal and social implications for public health and clinical practice [J]. Genome Med, 2014, 6 (11): 106. DOI: 10.1186/s13073-014-0106-2.
- [3] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products [J]. Chem Biol, 1998, 5 (10): R245–249. DOI: 10.1016/s1074-5521(98)90108-9.
- [4] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. Nature, 2010, 464 (7285): 59–65. DOI: 10.1038/nature08821.
- [5] Miller MB, Tang YW. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology [J]. Clin Microbiol Rev, 2009, 22 (4): 611–633. DOI: 10.1128/CMR.00019-09.
- [6] Palacios G, Druce J, Du L, et al. A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases [J]. N Engl J Med, 2008, 358 (10): 991–998. DOI: 10.1056/NEJMoa073785.
- [7] Xu B, Liu L, Huang X, et al. Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leukopenia syndrome (FTLS) in Henan Province, China: discovery of a new bunyavirus [J]. PLoS Pathog, 2011, 7 (11): e1002369. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002369.
- [8] Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome [J]. Genome Med, 2016, 8 (1): 51. DOI: 10.1186/s13073-016-0307-y.
- [9] Schlager R, Chiu CY, Miller S, et al. Validation of metagenomic next-generation sequencing tests for universal pathogen detection [J]. Arch Pathol Lab Med, 2017, 141 (6): 776–786. DOI: 10.5858/arpa.2016-0539-RA.
- [10] Blauwkamp TA, Thair S, Rosen MJ, et al. Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease [J]. Nat Microbiol, 2019, 4 (4): 663–674. DOI: 10.1038/s41564-018-0349-6.
- [11] Wilson MR, Naccache SN, Samayoa E, et al. Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing [J]. N Engl J Med, 2014, 370 (25): 2408–2417. DOI: 10.1056/NEJMoa1401268.
- [12] Loman NJ, Constantinidou C, Christner M, et al. A culture-independent sequence-based metagenomics approach to the investigation of an outbreak of Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* O104:H4 [J]. JAMA, 2013, 309 (14): 1502–1510. DOI: 10.1001/jama.2013.3231.
- [13] Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection [J]. Annu Rev Pathol, 2019, 14: 319–338. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751.
- [14] Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics [J]. Nat Rev Genet, 2019, 20 (6): 341–355. DOI: 10.1038/s41576-019-0113-7.
- [15] Wilson MR, Suan D, Duggins A, et al. A novel cause of chronic viral meningoencephalitis: Cache Valley virus [J]. Ann Neurol, 2017, 82 (1): 105–114. DOI: 10.1002/ana.24982.
- [16] Feng Y, Ramnarine VR, Bell R, et al. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of human prostate microbiota from patients with prostate cancer [J]. BMC Genomics, 2019, 20 (1): 146. DOI: 10.1186/s12864-019-5457-z.
- [17] Miao Q, Ma Y, Wang Q, et al. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied to clinical practice [J]. Clin Infect Dis, 2018, 67 (suppl_2): S231–S240. DOI: 10.1093/cid/ciy693.
- [18] Zhou X, Wu H, Ruan Q, et al. Clinical evaluation of diagnosis efficacy of active mycobacterium tuberculosis complex infection via metagenomic next-generation sequencing of direct clinical samples [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 351. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00351.
- [19] Fischer N, Rohde H, Indenbirken D, et al. Rapid metagenomic diagnostics for suspected outbreak of severe pneumonia [J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20 (6): 1072–1075. DOI: 10.3201/eid2006.131526.
- [20] Wang Q, Li J, Ji J, et al. A case of Naegleria fowleri related primary amoebic meningoencephalitis in China diagnosed by next-generation sequencing [J]. BMC Infect Dis, 2018, 18 (1): 349. DOI: 10.1186/s12879-018-3261-z.
- [21] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics [J]. Nat Rev Genet, 2009, 10 (1): 57–63. DOI: 10.1038/nrg2484.
- [22] Lefterova MI, Suarez CJ, Banaei N, et al. Next-generation sequencing for infectious disease diagnosis and management: a report of the association for molecular pathology [J]. J Mol Diagn, 2015, 17 (6): 623–634. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2015.07.004.
- [23] Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention [J]. J Biotechnol, 2017, 243: 16–24. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.12.022.
- [24] Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, et al. The human microbiome project [J]. Nature, 2007, 449 (7164): 804–810. DOI: 10.1038/nature06244.
- [25] Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. The integrative human microbiome project [J]. Nature, 2019, 569 (7758): 641–648. DOI: 10.1038/s41586-019-1238-8.
- [26] Forbes JD, Knox NC, Peterson CL, et al. Highlighting clinical metagenomics for enhanced diagnostic decision-making: a step towards wider implementation [J]. Comput Struct Biotechnol J, 2018, 16: 108–120. DOI: 10.1016/j.csbj.2018.02.006.
- [27] Ruppé E, Lazarevic V, Girard M, et al. Clinical metagenomics of bone and joint infections: a proof of concept study [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 7718. DOI: 10.1038/s41598-017-07546-5.
- [28] Flygare S, Simmon K, Miller C, et al. Taxonomer: an interactive metagenomics analysis portal for universal pathogen detection and host mRNA expression profiling [J]. Genome Biol, 2016, 17 (1): 111. DOI: 10.1186/s13059-016-0969-1.
- [29] Naccache SN, Federman S, Veeraraghavan N, et al. A cloud-compatible bioinformatics pipeline for ultrarapid pathogen identification from next-generation sequencing of clinical samples [J]. Genome Res, 2014, 24 (7): 1180–1192. DOI: 10.1101/gr.171934.113.
- [30] Greninger AL. The challenge of diagnostic metagenomics [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2018, 18 (7): 605–615. DOI: 10.1080/14737159.2018.1487292.
- [31] Cotten M, Oude MB, Canuti M, et al. Full genome virus detection in fecal samples using sensitive nucleic acid preparation, deep sequencing, and a novel iterative sequence classification algorithm [J]. PLoS One, 2014, 9 (4): e93269. DOI: 10.1371/journal.pone.0093269.
- [32] Eibach D, Hogan B, Sarpong N, et al. Viral metagenomics revealed novel betatorquevirus species in pediatric inpatients with encephalitis/meningoencephalitis from Ghana [J]. Sci Rep, 2019, 9 (1): 2360. DOI: 10.1038/s41598-019-38975-z.
- [33] Oniciuc EA, Likotrafiti E, Alvarez-Molina A, et al. The present and future of whole genome sequencing (WGS) and whole metagenome sequencing (WMS) for surveillance of antimicrobial resistant microorganisms and antimicrobial resistance genes across the food chain [J]. Genes (Basel), 2018, 9 (5): 268. DOI: 10.3390/genes9050268.

(收稿日期：2020-02-28)